

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00509

鱼类致病性豚鼠气单胞菌单克隆抗体-胶体金检测方法的建立

黄艺丹¹ 汪开毓¹ 郑建^{2,3} 黄锦炉¹

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 雅安 625014; 2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016;
3. Artron BioResearch 公司, 温哥华 V5J5H6)

摘要: 以福尔马林灭活的豚鼠气单胞菌按 2.5×10^7 个/只和 5.0×10^7 个/只分成两个剂量组免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤技术制备针对豚鼠气单胞菌的单克隆抗体(McAb), 用间接 ELISA 法对所需的杂交瘤细胞株进行特异性筛选, 获得了 2 株可分泌特异性 McAb 的杂交瘤细胞, 并分别命名为 3F3 和 2C9C3。经过鉴定, 这两株 McAb 能够特异性的针对豚鼠气单胞菌, 其抗体亚类分别为 IgG₁ 型和 IgM 型; 腹水效价分别为 10^{-6} 和 10^{-5} ; 相对亲和力较高; 3F3 针对豚鼠气单胞菌脂多糖表位, 而 2C9C3 针对非脂多糖抗原位点。利用实验制备的 McAb 建立了以 McAb 为基础的双抗夹心法膜式超灵敏胶体金快速检测方法, 所研制的豚鼠气单胞菌胶体金快速检测卡灵敏度好, 特异性高, 重复性好, 检测时间快, 操作简便, 为水产上豚鼠气单胞菌的快速鉴定和诊断以及该菌流行的监测提供有力的工具。

关键词: 豚鼠气单胞菌; 单克隆抗体; 生物特性; 胶体金

中图分类号: Q-31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)03-0509-08

豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)是危害我国淡水养殖业的重要致病菌之一。根据文献报道, 豚鼠气单胞菌能引起多种水产动物疾病, 虹鳟、甲鱼、鲤、鳊、金鱼、鲫、鲢、中华绒毛蟹和胡子鲇等都有感染的报道^[1-9], 其感染后可表现为败血症、肠炎、体表溃疡和竖鳞等病症。本实验室于 2008 年首次报道了由豚鼠气单胞菌引起的南方鲇溃疡综合症并进行了相关研究^[10,11]。豚鼠气单胞菌引发的疾病具有流行广、发病快、死亡高等特点, 对水产养殖动物危害极大, 造成巨大经济损失, 严重危害水产业的发展。豚鼠气单胞菌还会引起人类的感染, 据报道, 在井水、河水及海产品中气单胞菌的检出率达 4.15%^[12], 所以生食或半生食海产品有发生气单胞菌感染的潜在危险。也有资料指出, 除了普通的胃肠道感染之外, 该菌还会引起炎症性肠病^[13]和菌血症^[14]。在我国, 由水源及供水管道污染所致的水源性气单胞菌腹泻暴发事件屡有报道^[15]。目前,

水产上对豚鼠气单胞菌的检测主要还是依赖临床观察、解剖及一般细菌学检查法, 操作过程既繁琐又费时, 而且准确性不够, 可见建立具有快速且具特异性强等特点的方法是有效地防控豚鼠气单胞菌感染水生动物致病的关键。自 1975 年 Kohler 和 Milstein 发明单克隆抗体制备技术以来^[16], 国内外有许多种单克隆抗体问世, 并广泛用于临床诊断、治疗及基础研究之中。单克隆抗体(McAb)由于其特异性高, 灵敏度好, 应用在致病性细菌的诊断和防治等方面有传统方法无法比拟的优越性。利用单克隆抗体研制成的胶体金快速检测卡在此基础上使得疾病的检测更加简便, 不再受实验室和专业实验人员的限制, 具有广阔的推广前景。本实验制备了抗豚鼠气单胞菌菌体 McAb, 对其生物特性进行了鉴定, 并利用制备的 McAb 首次研制了该菌的检测胶体金试纸条, 旨在建立一种快捷、准确的鱼类豚鼠气单胞菌病诊断方法。

收稿日期: 2009-01-04; 修订日期: 2009-11-29

基金项目: 农业部动物检验检疫检测与防治项目(2130108); 中央级农业公益性行业科研专项经费项目(200803013); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 加拿大合作项目(Artron BioResearch 公司 2007)资助

作者简介: 黄艺丹(1985—), 女, 汉族, 四川成都人; 硕士; 主要研究方向为水生动物病害学。E-mail: dannihyd@163.com

通讯作者: 汪开毓(1955—), 男, 汉族; 教授, 博导; 主要研究方向为水生动物病理学与药理学。E-mail: kywang@sicau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

豚鼠气单胞菌为四川农业大学鱼病研究中心 2005 年分离自四川通威南方鲈养殖基地具有典型流行性溃疡综合症的南方鲈鱼体, 具有强致病性, 经生理生化和 16S rDNA 鉴定为豚鼠气单胞菌。嗜水气单胞菌、维里纳气单胞菌、克鲁氏耶尔森菌、海豚链球菌、嗜麦芽寡养单胞菌由四川农业大学鱼病研究中心提供, 大肠杆菌(ATCC 25922)由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室提供。6—8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 质量 20 g 左右, 购自重庆医科大学实验动物中心。福氏佐剂、PEG4000、Protease K、Protein G 亲和层析柱、鼠抗体 IgG 亚类 ELISA 试剂盒均购自 Sigma 公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购于北京中杉金桥公司。TMB 显色剂购于天根生化科技(北京)有限公司。BSA (MBI 分装)购自上海生工生物技术有限公司。HAT、HT、RPMI1640 培养基为 GIBCO 公司产品。胎牛血清为 Hyclone 公司产品。Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室保存。Tween 20、考马斯亮蓝 G-250、DNaseI、RNase A、硫酸铵、饱和酚等购自北方同正公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

BALB/c 小鼠的免疫 将豚鼠气单胞菌菌种接种于 TSB 肉汤 28℃ 培养 24h, 在培养 24h 的细菌菌液中加入 8% 福尔马林灭活。将灭活的菌液置 4℃ 4000 r/min 离心 20min, 弃上清, 用生理盐水洗两次, 后重悬于生理盐水中, 置于 4℃ 冰箱待用。用灭活的豚鼠气单胞菌免疫 BALB/c 小鼠, 免疫剂量按每只 2.5×10^7 个和每只 5.0×10^7 个分两个剂量组, 将疫苗菌与等体积的福氏完全佐剂混合至完全乳化, 对小鼠腋下、腹股沟皮下多点注射进行基础免疫。此后, 每隔 2 周以同等剂量豚鼠气单胞菌加等体积福氏不完全佐剂完全乳化后加强免疫, 共 3 次。融合前 3 天对抗体效价高的(10^{-5} 以上)小鼠尾静脉注射加强免疫(5.0×10^7 个/只)

杂交瘤细胞的建立及 McAb 腹水的制备 在追加免疫后的第 3 天, 用 50% 的 PEG4000 作融合剂, 取免疫小鼠的脾细胞与 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞按常规方法进行细胞融合^[17], 用 HAT 培养基进行选择

培养, 用间接 ELISA 法筛选能分泌特异性抗体的杂交瘤细胞, 测定其培养上清 A_{450} , 其 A_{450} 大于阴性值 2 倍以上为阳性^[18]。通过软琼脂半固法^[17]克隆化培养筛选所需的杂交瘤细胞株, 按常规方法制备腹水^[19]。用盐析法及 Protein G Sepharose 亲和层析法^[19]分离纯化腹水中抗豚鼠气单胞菌的 McAb。

McAb 的免疫反应特异性鉴定 间接 ELISA 方法。用杂交瘤细胞上清液经间接 ELISA 法检测特异性反应和交叉反应, 对杂交瘤细胞进行筛选。用灭活的豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌、维里纳气单胞菌、克鲁氏耶尔森菌、海豚链球菌、大肠杆菌的菌液包被 96 孔酶标板(10 μ g/mL), 以免疫小鼠阳性血清为阳性对照、SP2/0 为阴性对照, 一抗为抗豚鼠气单胞菌阳性的杂交瘤细胞培养上清, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 用 TMB 显色并测定 A_{450} 。阳性克隆为只与豚鼠气单胞菌反应的杂交瘤细胞株。

腹水 McAb 的效价及 Ig 亚类的鉴定 将腹水标本进行梯度稀释, 采用间接 ELISA 方法进行腹水 McAb 的效价测定, 以产生阳性反应的样品最高稀释倍数为其效价。按照试剂盒(Sigma)说明书进行 McAb Ig 亚类的鉴定。

单克隆抗体相对亲和力的测定 采用间接 ELISA 法测定^[20,21]。用灭活的豚鼠气单胞菌菌液包被 96 孔酶标板(10 μ g/mL), 一抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 用 TMB 显色, 于波长 450 nm 测定 OD 值并绘制标准曲线。以各曲线上部趋于平坦段的 OD 值为 100%, 取 OD 值为 50% 的点相对应的 McAb 的浓度, 即为各株 McAb 的相对亲和力。

单克隆抗体的位点相加实验 参照 Friguete, et al.^[21]的 ELISA 相加实验进行测定。即采用竞争 ELISA, 用灭活豚鼠气单胞菌菌液包被 96 孔酶标板(2 μ g/mL), 一抗分别为 2 株腹水单抗(100 μ L/孔)以及每种单抗各取 50 μ L 后两两组合形成的抗体混合物, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, TMB 显色后于波长 450 nm 测定 OD 值。相加指数 $AI = [(2A_{1+2}) / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$, 式中 A_1 、 A_2 分别为单独加一株单抗的 OD 值, A_{1+2} 代表两株单抗组合后所测 OD 值, $AI > 40\%$ 表示两株单抗针对不同抗原表位; $AI < 25\%$ 表示两株单抗针对相同表位^[22]。

单克隆抗体识别抗原表位的初步分析 参照 Carlson, et al.^[23]及 Carrion et al.^[24]修改后酚-硫酸法的方法, 提取豚鼠气单胞菌的 LPS。并用提取的各细

菌的脂多糖分别包被酶标板, 一抗分别为 3F3、2C9C3 两株腹水单抗(1:1000 稀释), 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:10000 稀释), TMB 显色后于波长 450 nm 测定 OD 值, 初步判断 McAb 所针对的抗原成分。

胶体金的制备 以柠檬酸盐还原法制备 40—60 nm 的胶体金。将 0.01% HauCl_4 加热至沸, 加入一定量的 1% 柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 继续加热煮沸 5min, 待胶体金溶液颜色由蓝→紫→红, 稳定后, 冷却即可。胶体金溶液应清亮透明, 如需长期保存, 可加入 0.02% NaN_3 。

金标豚鼠气单胞菌单克隆抗体的制备 将适合浓度的纯化单抗加于调定 pH 及离子强度的胶体金溶液中, 放置室温反应 2min。加入终浓度为 0.2% 的 PEG。4000 r/min 离心 30min, 将红色沉淀吸入另一 12 mL 离心管, 清液以 8000 r/min 离心 30min, 取沉淀。沉淀用胶体金保护剂悬浮, 稀释至工作浓度(通常为 $A_{532}=30-40$)4℃ 保存, 或喷涂于无纺布薄膜, 37℃ 烘干后, 放入铝箔袋中, 并放入干燥剂, 封口, 4℃ 保存。

反应膜(M1)的制备 NC 膜活化处理, 水洗, 干燥。将豚鼠气单胞菌单抗以 0.1 mol/L PBS 稀释至一定浓度(约 1.6 mg/mL)。取纯化的羊抗鼠 IgG 溶于 0.1 mol/L PBS 中, 浓度为 1.0 mg/mL。将制备好的豚鼠气单胞菌单抗液在 NC 膜上包被反应检测线, 以 1.0 mg/mL 羊抗鼠 IgG 包被反应对照线, 对照线与检测线的距离为 4—4.5 mm。完成包被后, 置 37℃ 干燥箱 24h。用 BB 封闭液封闭处理 30min。用 WB 洗液抽洗一次。37℃ 干燥箱干燥备用。

膜反应体系 M2a、M2b 及 M3 的制备 将吸水纤维素膜分别浸泡于 M2a、M2b、M3 溶液中, 浸透后, 取出晾干, 装入塑料袋中, 室温保存。M2a 制备: 将制好的玻璃纤维切 27 cm×1.2 cm/条; M2b 制备: 将制好的玻璃纤维切 27 cm×1.8 cm/条; M3 制备: 将制好的玻璃纤维切 27 cm×1.2 cm/条。

膜反应体系 M4 的制备 取胶体金-豚鼠气单胞菌单抗复合物加稀释液, 混匀配成工作浓度; 将溶液加入喷涂机 Biodot 的 Airjet 喷头储存瓶中; 设定压力为 15PSI, 玻璃纤维膜的移动速度为 50 mm/s; 喷制规格为(0.5—1.5) cm×25 cm/条, 每条喷 2 遍; 于 37℃ 烘干 12h, 放入铝薄袋中, 加入干燥剂, 热合封口, 室温保存。

反应体组装(图 1) 在 M6 塑料基板上贴双面胶

带 M7 (25 mm×50 mm)二条; 在 M7 中间贴反应膜 M1 (18 mm), 离 M6 上缘约 22 mm; 在 M7 上贴 M5 (22 mm), 与 M6 上缘对齐并与 M1 上缘交 1 mm; 在 M7 上贴 M2 (8 mm), 与 M1 下缘相接。在 M2 上贴 M4 (5 mm), 压住 M1 下缘 0.5 mm。在 M7 上贴 M3 (18 mm), 上缘压住 M4 约 2/3, 下缘与 M7 的下缘对齐; 在 M4 和 M7 上贴透明胶带 M8 (8 mm), 上缘完全压住 M4, 并压住 M1 约 1.5 mm; 将组装成型的反应体用全自动切条机切成 4 mm 规格。

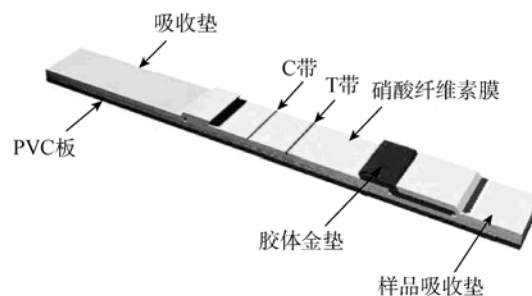


图 1 胶体金试纸条制备模式图

Fig. 1 Model of strip

胶体金试纸条检测豚鼠气单胞菌菌液 将豚鼠气单胞菌胶体金试纸条样品端浸入豚鼠气单胞菌活菌液及灭活菌液中, 待液体将整个 NC 膜充分浸润后取出, 室温放置 3—10min, 观察质控线及检测线显色情况, 阳性反应出现上下两条红线, 即质控线和检测线, 阴性反应只出现一条红线, 即质控线, 否则该试纸条无效。

胶体金试纸条的敏感性测试 将豚鼠气单胞菌活菌液进行细菌计数后做倍比稀释, 从 6.86×10^9 cfu/mL 一直稀释到 8.55×10^3 cfu/mL, 用胶体金试纸条检测, 评价其最低检测量。

胶体金试纸条的特异性测试 用胶体金试纸条检测嗜水气单胞菌、维里纳气单胞菌、克鲁氏耶尔森菌、海豚链球菌、嗜麦芽寡养单胞菌菌液, 同时以生理盐水为阴性对照, 评价特异性及交叉反应情况。

胶体金试纸条的重复性测试 用胶体金试纸条各检测 3 份豚鼠气单胞菌阳性菌液及 3 份阴性对照菌液, 每个样品重复检测 10 次。

2 结 果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

细胞克隆化后经间接 ELISA 筛选获得能稳定分

泌抗豚鼠气单胞菌特异性 McAb 的细胞株共 3 株, 分别命名为 2D5、3F3 和 2C9C3。将杂交瘤细胞液氮保存 3 月后复苏细胞, 连续 3 个月传代, 这 3 株细胞株仍能稳定分泌特异性的 McAb。

2.2 McAb 的特异性鉴定

经过交叉反应测试发现, 3F3 和 2C9C3 特异性较高, 而 2D5 则与气单胞菌属的其他菌发生了交叉

反应。McAb 与其他相关细菌的交叉反应实验(表 1)。

2.3 腹水 McAb 的效价及 Ig 亚类的鉴定

通过间接 ELISA 检测杂交瘤细胞株 3F3 和 2C9C3 诱生的小鼠腹水效价, 其中 3F3 的腹水的效价为 10^{-6} , 2C9C3 的腹水效价为 10^{-5} (表 2)。用细胞培养上清进行间接 ELISA 反应检测抗体的 Ig 亚类, 结果表明, 3F3 为 IgG1 型, 2C9C3 为 IgM 型(表 3)。

表 1 单克隆抗体 ELISA 特异性检测结果(OD 值)

Tab. 1 The reaction of the McAbs against various bacterial genera (OD value) ($\bar{X} \pm S, n = 3$)

		菌株 Bacteria					
		豚鼠气单胞菌 <i>Aeromonas caviae</i>	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	维里纳气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	链球菌 <i>Streptococcus</i>	克鲁氏耶尔森菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
单抗 编号 McAb No.	2D5	0.918±0.023	0.875±0.017	0.893±0.006	0.283±0.003	0.267±0.01	0.204±0.026
	3F3	1.099±0.017	0.128±0.021	0.236±0.006	0.132±0.015	0.129±0.021	0.134±0.014
	2C9C3	1.032±0.005	0.146±0.013	0.287±0.022	0.239±0.02	0.212±0.015	0.127±0.023
	Negative	0.119±0.10					

表 2 单克隆抗体效价测定(OD 值)

Tab. 2 Titres of McAbs by ELISA (OD value) ($\bar{X} \pm S, n = 3$)

单抗编号 McAb No.	1 : 10^3	1 : 10^4	1 : 10^5	1 : 10^6	1 : 10^7	1 : 10^8
3F3	1.973±0.003	1.484±0.013	0.987±0.021	0.441±0.023	0.202±0.034	0.151±0.012
2C9C3	1.102±0.013	0.768±0.022	0.548±0.016	0.23±0.017	0.183±0.003	0.125±0.021
Negative	0.134±0.009					

表 3 单克隆抗体亚类测定的 ELISA 实验结果(OD 值)

Tab. 3 Analysis of McAb subtype by indirect ELISA (OD value)

单抗编号 McAb No.	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
3F3	0.804	0.096	0.159	0.109	0.123	0.075
2C9C3	0.204	0.230	0.269	0.293	2.50	0.193
Negative	0.112	0.105	0.142	0.106	0.120	0.073

2.4 单克隆抗体相对亲和力的测定

通过间接 ELISA 法测定并作图表明 3F3 与 2C9C3 的相对亲和力均大于 10^5 (图 2)。

2.5 单克隆抗体的位点相加实验

通过单克隆抗体的位点相加实验来证实 2 株 McAb 是否针对相同的表位(表 4)。从表中可看到 3F3, 2C9C3 这两株单抗之间的 AI 值>40%, 说明它们针对的是不同表位。

2.6 单克隆抗体识别抗原表位的初步分析

通过间接 ELISA 法检测 2 株 McAb 是否针对豚鼠气单胞菌的脂多糖(LPS)位点(表 5), 可以看出 3F3 的检测结果为阳性, 即针对脂多糖表位, 而

2C9C3 为阴性, 针对非脂多糖表位。

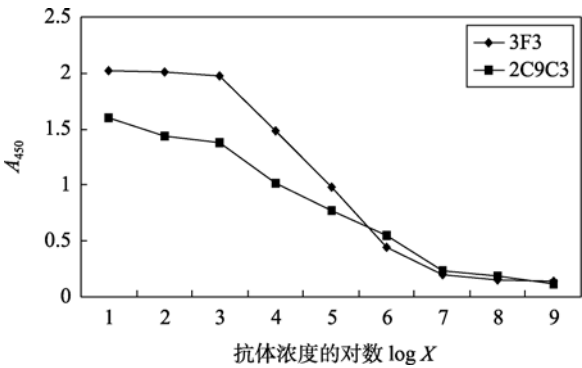


图 2 3F3 和 2C9C3McAb 相对亲和力分析
Fig. 2 Relative affinity analyse of McAb 3F3 and 2C9C3

表 4 表位分析的 ELISA 相加实验结果
Tab. 4 Identification of epitopes by additive ELISA

	3F3	2C9C3
3F3	0.92	1.070(47.99%)
2C9C3	—	0.526

表 5 表位分析的间接 ELISA 实验结果
Tab. 5 Identification of epitopes by indirect ELISA

单抗编号 McAb No.	3F3	2C9C3	阴性对照 Negative
豚鼠气单胞菌 LPS	0.764	0.137	0.103
LPS of <i>Aeromonas caviae</i>			

2.7 豚鼠气单胞菌菌液检测结果

可见无论是活菌液还是灭活菌液, 试纸条结果显示区内出现两条清晰的紫红色条带, 靠近标签端为质控线, 靠近样品端为检测线(图 3)。

2.8 敏感性检测结果

结果显示试纸条对菌液的最低检测浓度为 1.71×10^4 cfu/mL (图 4)。

2.9 特异性检测结果

结果显示胶体金试纸条检测豚鼠气单胞菌出现

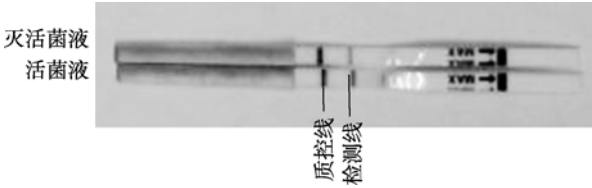


图 3 胶体金试纸条检测豚鼠气单胞菌菌液结果
Fig. 3 Results of *Aeromonas caviae* detected by strips

阳性结果, 而与嗜水气单胞菌、维里纳气单胞菌、克鲁氏耶尔森菌、海豚链球菌、嗜麦芽寡养单胞菌菌液均显示阴性(菌液浓度为 6.86×10^9 cfu/mL), 表明该试纸条特异检测豚鼠气单胞菌, 特异性为 100% (图 5)。

2.10 重复性检测结果

用胶体金试纸条各检测 3 份豚鼠气单胞菌阳性菌液及 3 份阴性对照菌液, 结果显示: 阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 100% (表 6)。

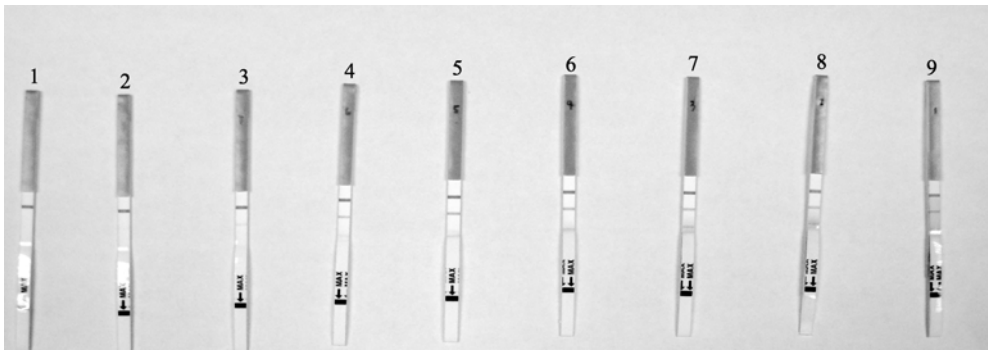


图 4 胶体金试纸条敏感性检测结果
Fig. 4 Results of sensitivity test by strips

1. 8.55×10^3 cfu/mL; 2. 1.71×10^4 cfu/mL; 3. 3.43×10^4 cfu/mL; 4. 6.86×10^4 cfu/mL; 5. 6.86×10^5 cfu/mL; 6. 6.86×10^6 cfu/mL; 7. 6.86×10^7 cfu/mL; 8. 6.86×10^8 cfu/mL; 9. 6.86×10^9 cfu/mL

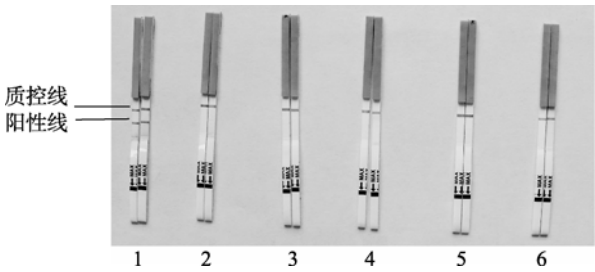


图 5 胶体金试纸条特异性检测结果
Fig. 5 Results of specificity test by strips

1. 豚鼠气单胞菌 *A. caviae*; 2. 维里纳气单胞菌 *A. veronii*; 3. 克鲁氏耶尔森菌 *Y. ruckeri*; 4. 嗜水气单胞菌 *A. hydrophila*; 5. 嗜麦芽寡养单胞菌 *S. maltophilia*; 6. 海豚链球菌 *S. iniae*

表 6 重复性检测结果
Tab. 6 Results of repeatability test

标准样品 Type Samples	检测结果 Results	检测总数 Total	符合率 Coincidence (%)
试纸条检测 阳性样品 Positive Samples	30(+)	30	100 (30/30)
试纸条检测 阴性样品 Negative Samples	30(-)	30	100 (30/30)

3 讨 论

单克隆抗体在水产疾病的诊断^[25]、免疫^[26]以及渔药残留检测^[27]等方面的应用有着广阔的前景:通过分子免疫学方法,制备亲和力高的单克隆抗体,将为豚鼠气单胞菌的诊断和监测提供新的手段。本实验以豚鼠气单胞菌作为免疫原,采用杂交瘤技术,成功获得了 2 株能稳定分泌抗豚鼠气单胞菌单抗的杂交瘤细胞株 3F3 和 2C9C3。我们对单抗进行了包括亚型鉴定、效价以及特异性的鉴定与分析,结果显示 3F3 和 2C9C3 只与豚鼠气单胞菌发生反应,而与其他参考菌株无交叉反应,具有较强特异性。经鉴定该两株 McAb 稳定性好、特异性好、亲和力较高、效价高,进一步证实这两株 McAb 达到了抗体用于诊断试剂亲和力的要求^[28]。因此,这两株 McAb 可用于豚鼠气单胞菌的临床检测,同时可用于豚鼠气单胞菌抗原检测方法的建立。此外,我们对获得的这两株 McAb 进行了更深入的研究,通过单克隆抗体的位点相加实验表明 3F3 和 2C9C3 这两株 McAb 针对的是不同抗原表位,识别不同的抗原决定簇,经间接 ELISA 实验证实 3F3 针对豚鼠气单胞菌脂多糖,而 2C9C3 针对非脂多糖抗原位点。确立抗体识别的抗原表位不仅可了解抗原的结构与功能、抗原抗体相互作用等有关免疫反应的众多信息,而且对设计基于表位的安全有效的疫苗以及开发基于表位的诊断试剂有重要意义^[29]。我们制备了针对豚鼠气单胞菌抗原不同位点的特异性单克隆抗体,为下一步建立以单克隆抗体为基础的检测豚鼠气单胞菌的胶体金免疫层析快速检测试纸条奠定了基础。

免疫胶体金技术是四大免疫标记技术之一,问世 20 多年来发展十分迅速,在生物医学各研究领域特别是在医学检验中得到了日益广泛的应用^[30]。胶体金具有高电子密度,能与多种生物大分子结合,已成为继荧光素、放射性同位素和酶之后,在免疫标记技术中常用的一种非放射性示踪剂。胶体金试纸条根据双抗体夹心法、双抗原夹心法和竞争抑制法免疫反应原理设计,以胶体金作为指示标志,标记在抗原或抗体上,抗原抗体发生免疫反应后显色,根据显色深浅定性检测标本中的抗体或抗原。本实验研制的胶体金豚鼠气单胞菌胶体金快速检测卡,采用高度特异性的抗原抗体反应及胶体金标记技术,

通过双抗体夹心法(单克隆抗体-抗原-单克隆抗体),建立了以单克隆抗体为基础的双抗夹心法膜式超灵敏胶体金快速检测方法,以实现豚鼠气单胞菌抗体抗原的特异检测。通过对本实验研制成的抗豚鼠气单胞菌胶体金快速检测试纸条进行了一系列的性能测试之后,其菌株检测结果表明,该试纸条特异性高,与嗜水气单胞菌、维里气单胞菌、克鲁氏耶尔森菌、海豚链球菌、嗜麦芽寡养单胞菌细菌无交叉反应,特异性为 100%;线性好,对豚鼠气单胞菌培养液进行倍比稀释,再取不同浓度的液体进行检测,检测线上出现明显的颜色深浅与待测液的抗原含量成正比,抗原含量越高,色线颜色越深,反之,色线颜色越浅;灵敏度高,最低可检出细菌数为 1.71×10^4 cfu/mL,重复性 100%。使用本试纸进行检测,只需要将试纸条样品端插入待测液中片刻,取出平放,在室温下 5min 就可判定结果,检测结果直观、灵敏度好、特异性高、重复性、检测时间快、操作简便。因此本测试纸条可以对引起感染的豚鼠气单胞菌进行快速的鉴定和诊断,为水产上豚鼠气单胞菌病的监测提供更便捷和准确的方法。

参考文献:

- [1] Ding L, Yue Y S, Song J Y. Studies on pathogen of skin-ulcerating disease of *Salmo gairdneri* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2002, 32(3): 28—30 [丁雷, 岳永生, 宋憬愚. 虹鳟皮肤溃烂病的病原菌研究. 淡水渔业, 2002, 32(3): 28—30]
- [2] Sun H X, Shu M A. Isolation, identification and drug sensitivity of the pathogens of common bacteritic disease in soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2002, 22(2): 140—142 [孙红祥, 舒妙安. 中华鳖几种常见疾病病原的分离鉴定及药敏试验. 中国兽医报, 2002, 22(2): 140—142]
- [3] An L G, Xing W X, Fu R S. Study on the pathology and immunological prevention of carp dropsy epidemiology and aetiology of the carp dropsy [J]. *Journal of Shandong Normal University (Natural Science)*, 1996, 11(3): 68—72 [安利国, 邢维贤, 傅荣恕. 鲤鱼竖鳞病的流行病学和病原学的研究. 山东师大学报(自然科学版), 1996, 11(3): 68—72]
- [4] Fan H P, Zeng Z Z, Yu P J, et al. The septicaemia of anguilla anguilla infected by *Aeromonas caviae* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1999, 23(3): 313—318 [樊海平, 曾占壮, 余培建, 等. 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症. 水产学报, 1999, 23(3): 313—318]
- [5] Xu X G, Yi L, Wang G X. Isolation, identification, prevention and cure of *Aeromonas caviae* from goldfish [J]. *Acta*

- Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2006, **15**(1): 40—42 [许信刚, 伊岚, 王高学. 观赏金鱼豚鼠气单胞菌的分离鉴定及防治. 西北农业学报, 2006, **15**(1): 40—42]
- [6] Li X B, Huang W F. Study on the bacterial septicemia of *Carassius auratus* of penze (♀) × *Cyprinus actiodorsalis* (♂) I-isolation and identification of the pathogen [J]. *Microbiology*, 2003, **30**(5): 56—60 [李小波, 黄文芳. 丰产鲫细菌性败血病的研究 I-病原分离与鉴定. 微生物学通报, 2003, **30**(5): 56—60]
- [7] Chen C Z, Zhang X J, Fang H, et al. Biological characteristics and phylogenetic analysis of *Aeromonas caviae* isolated from hypophthalmichthys molitrix and aristichthys nobilis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, **22**(5): 455—459 [陈翠珍, 张晓君, 房海, 等. 鲢鳙打印病豚鼠气单胞菌主要特性及系统发育学分析. 中国农学通报, 2006, **22**(5): 455—459]
- [8] Xu H S, Huang L F, Wang S X. Isolation and identification of *Aeromonas caviae* from *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2001, **27**(6): 677—681 [徐海圣, 黄立峰, 王淑霞. 中华绒螯蟹豚鼠气单胞菌的分离和鉴定. 浙江大学学报, 2001, **27**(6): 677—681]
- [9] Huang W J, Huang J, Qin A Z. Isolation and identification of causative agent causing ascites in wild beard catfishes [J]. *Veterinary Science in China*, 2000, **30**(4): 30—33 [黄伟坚, 黄均, 秦爱珍. 野生胡子鲇“腹水病”病原分离和鉴定. 中国兽医科技, 2000, **30**(4): 30—33]
- [10] Ji L L, Wang K Y, Xiao D, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing ulcer disease of *Silurus meridionalis* Chen [J]. *Freshwater fisheries*, 2008, **38**(3): 68—72 [吉莉莉, 汪开毓, 肖丹, 等. 南方鲇溃疡综合症病原菌的分离与鉴定. 淡水渔业, 2008, **38**(3): 68—72]
- [11] Yang T, Wang K Y, Xiao D, et al. Study on activity and pathogenicity of extracellular products of *Aeromonas caviae* isolated from *Silurus meridionalis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, **38**(2): 40—46 [阳涛, 汪开毓, 肖丹, 等. 南方鲇源豚鼠气单胞菌胞外产物活性与致病性研究. 淡水渔业, 2008, **38**(2): 40—46]
- [12] Xu J Y, Fu X H, Yu M. Detection of aeromonas trota in marine products of mussel and crustaceans in Ningbo, China [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2001, **8**(6): 441—442 [徐景野, 傅小红, 于梅. 宁波市贝(甲)壳类海产品易损气单胞菌检出情况. 实用预防医学, 2001, **8**(6): 441—442]
- [13] Van Der Gaag E J, Roelofsen E, Tummers R F. *Aeromonas caviae* infection mimicking inflammatory bowel disease in a child [J]. *Ned Tijdschr Geneeskde*, 2005, **149**(13): 712—714
- [14] Teira R, Hernandez J L, Rojo P, et al. Bacteremia of biliary origin caused by *Aeromonas caviae* in a healthy patient [J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 1991, **9**(6): 388—389
- [15] Chen J Y, Wang H X. Epidemiological investigation of a water-sourced diarrhea [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2003, **10**(6): 1012—1013 [陈金燕, 王洪霞. 一起水源性腹泻暴发的调查. 实用预防医学, 2003, **10**(6): 1012—1013]
- [16] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, **256**: 495—497
- [17] Situ Z Q, Wu J Z. Cell Culture [M]. Xi'an: World Book Press. 1996, 232—242 [司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社. 1996, 232—242]
- [18] Zhang Q P, Wang J, Liu S W. Experimental technique of medical immunology [M]. Wuhan: Wuhan University Press. 2002, 20—50 [张秋萍, 王瑾, 刘胜武. 医学免疫学实验技术. 武汉: 武汉大学出版社. 2002, 20—50]
- [19] Wang J Z, Fan M. Manuals of protein technical [M]. Beijing: Science Press. 2002, 238—243 [汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2002, 238—243]
- [20] Su J, Zhang Y L, You C X, et al. The preparation and identification of anti-human NGF monoclonal antibody [J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2002, **18**(2): 168—170 [苏谨, 张亚莉, 尤长宣, 等. 抗人 NGF 单克隆抗体的制备及初步鉴定. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, **18**(2): 168—170]
- [21] Friguet B, Diavadi O, Pages J, et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site and application to hybridomes specific for the beta 2-subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, **60**(3): 351—354
- [22] Gan L, Zhang Y P, Xiao G X. Production and identification of monoclonal antibodies against *Bacteroids fragilis* [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 1999, **21**(7): 485—487 [甘露, 张雅萍, 肖光夏. 抗脆弱类杆菌单克隆抗体的研制和鉴定. 第三军医大学学报, 1999, **21**(7): 485—487]
- [23] Carlson R W, Kalembsa S, Turowski D, et al. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(11): 4923—4928
- [24] Carrion M, Bhat U R, Reuhs B, et al. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**(4): 1725—1731
- [25] Huang J, Liang M L, Zhu Y. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against *Aeromonas Sobria* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2006, **5**(1): 108—110 [黄钧, 梁明龙, 朱芸. 温和气单胞菌单克隆抗体的制备及特性分析. 河南农业科学, 2006, **5**(1): 108—110]
- [26] Jin X H, Huang W Q, Xia Y J, et al. Preparation and identification of anti-idiotypic monoclonal antibody against *Edwardsiella tarda* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(3): 340—343 [金晓航, 黄威权, 夏永娟, 等. 迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体的制备及鉴定. 水生生物学报, 2005, **29**(3): 340—343]
- [27] Gong P F, Wang Q, Chen Y J. Preparation and identifica-

- tion of monoclonal antibody against malachite green [J]. *Veterinary Science in China*, 2007, 37(4): 359—362 [龚鹏飞, 王权, 陈永军. 孔雀石绿单克隆抗体的制备及其鉴定. 中国兽医科学, 2007, 37(4): 359—362]
- [28] Deshpande S S. Enzyme immunoassay from concept to product development [M]. New York: Chapman and Hall. 1996, 52
- [29] Wang L F, Yu M, Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics [J]. *Current Drug Targets*, 2004, 5(1): 1—15
- [30] Bendayan M. A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology (Review) [J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 2000, 75(5): 203—242

DEVELOPMENT OF A RAPID DETECTION METHOD ON MONOCLONAL ANTIBODIES CONJUGATING TO COLLOIDAL GOLD AGAINST PATHOGENIC *AEROMONAS CAVIAE* IN FISH

HUANG Yi-Dan¹, WANG Kai-Yu¹, ZHENG Jian^{2,3} and HUANG Jin-Lu¹

(1. Research Center of Fish Diseases, Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014; 2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 3. Artron BioResearch Inc., 3938, North Fraser Way, Burnaby, BC V5J 5H6, Canada)

Abstract: The purpose of this study was to prepare *Aeromonas caviae* hybridoma cell lines, and to establish the rapid, super sensitive detection method of 'double-antibody-sandwich' membrane colloidal gold basing on monoclonal antibodies that was used for the rapid diagnosis of *Aeromonas caviae*. In this study, BALB/c mice were immunized with *Aeromonas caviae* killed by formalin as the dosage of 2.5×10^7 cell per mouse and 5.0×10^7 cell per mouse respectively. The hybridoma cell lines which consistently secreted monoclonal antibody (McAb) against *Aeromonas caviae* were obtained through cell fusion. The specificity of the McAb was analysed by indirect ELISA. Then the subtypes were identified, the titer and affinity constant were measured, and its specificity was analyzed. Tests were made to identify the antigen epitope of the two McAbs by combined experimental site and indirect ELISA with LPS of *Aeromonas caviae*. The McAb conjugating to colloidal gold against *Aeromonas caviae* was established, and its specificity, sensitivity, repeatability was estimated respectively. From over hundreds of positive hybridomas which secreted anti-*Aeromonas caviae* McAbs, two strains of hybridomas were screened out, and designated with 3F3 and 2C9C3. The subtypes of the McAb were IgG₁ and IgM. The titer of 3F3 and 2C9C3 McAb produced by ascites fluid were $1 : 10^6$ and $1 : 10^5$. The McAbs had high relative affinity. The two strains of monoclonal antibodies were targeted to different antigen epitope: 3F3 was targeted to the LPS of *Aeromonas caviae*, while 2C9C3 was targeted to the non-LPS sites of *Aeromonas caviae*. Basing on the McAbs, the rapid detection McAbs conjugating to colloidal gold against *Aeromonas caviae* was developed to detect the thalli antigen of *Aeromonas caviae* specifically. Therefore, the results demonstrated that this method had high specificity, sensitivity and repeatability. It could serve as an effective detection measure for clinic, and as the method of the rapid identification for *Aeromonas caviae* in aquaculture and monitoring the epidemic of *Aeromonas caviae*.

Key words: *Aeromonas caviae*; Monoclonal antibody; Biological Characteristic; Colloidal gold